

天津发酵工业科学研究成果汇编

第 二 辑

内 部 资 料

天津市工业微生物研究所
天津市工业微生物情报站

一九七六年六月

前 言

经过无产阶级文化大革命和批林批孔运动，我所广大工人、干部和科技人员在毛主席革命路线指引下，以阶级斗争为纲，狠批刘少奇、林彪鼓吹的“洋奴哲学”、“爬行主义”等反革命修正主义路线，坚持科学研究为无产阶级政治服务，为工农兵服务，与生产劳动相结合，坚持开门办科研，面向生产，坚持“独立自主、自力更生”的方针，坚持群众路线，坚持党对科研工作的一元化领导，以毛主席光辉的哲学思想为指导，在有关兄弟单位密切协作下，在工业发酵研究、试制新型发酵产品诸方面，都取得了新的进展，获得了新的成绩。特别是最近几年，为了贯彻落实毛主席关于“深挖洞、广积粮、不称霸”的指示，积极开展石油发酵生产柠檬酸的研究，现已初步建成石油柠檬酸发酵车间；薯干原料发酵柠檬酸新菌种正在生产上收到良好的效果；糖化酶菌种的选育获得了可喜的成就。事实雄辩地证明：“无产阶级文化大革命是使我国社会主义生产力发展的一个强大的推动力”。

为了歌颂文化大革命的伟大胜利，我们组织有关同志编写了这本汇编。

本汇编是继一九七〇年“天津发酵工业科学研究成果汇编”第一辑，重点编写一九七〇年至一九七五年以来已投入生产和具有工业化生产价值的科研成果。为便于“互通情报”交流经验，本汇编作为内部资料发行，供参考使用。由于水平所限，错误和不当之处，请同志们批评指出。

天津市工业微生物研究所

天津市工业微生物情报站

一九七六年六月

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

在生产斗争和科学实验范围内，人类总是不断发展的，自然界也总是不断发展的，永远不会停止在一个水平上。因此，人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

抓革命，促生产，促工作，促战备。

毛主席语录

千万不要忘记阶级斗争。

团结起来，为了一个目标，就是巩固无产阶级专政，要落实到每个工厂、农村、机关、学校。

这次无产阶级文化大革命，对于巩固无产阶级专政，防止资本主义复辟，建设社会主义，是完全必要的，是非常及时的。

无产阶级文化大革命是使我国社会主义生产力发展的一个强大的推动力。

自力更生，艰苦奋斗，破除迷信，解放思想。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

在生产斗争和科学实验范围内，人类总是不断发展的，自然界也总是不断发展的，永远不会停止在一个水平上。因此，人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

抓革命，促生产，促工作，促战备。

目 录

一、开门办所好	1
二、石油发酵生产柠檬酸试验部分	4
1.解脂假丝酵母B ₇₄ 利用液体石蜡发酵生产柠檬酸的研究	4
2.解脂假丝酵母8—2利用液体石蜡生产柠檬酸的研究	31
3.石油发酵柠檬酸扩大试验报告	39
4.石油柠檬酸中3、4苯并芘的初步测定	60
5.石油柠檬酸与糖质柠檬酸的急性与亚急性毒性试验	66
6.石油发酵工业用柠檬酸试验鉴定意见	72
7.石油发酵柠檬酸扩大试验鉴定意见	73
三、薯干原料发酵生产柠檬酸试验部分	75
1.柠檬酸产生菌 γ -144选育和发酵条件的研究	75
2.柠檬酸新菌种 γ -144生产试验总结	89
四、提高葡萄糖淀粉酶产量的研究	96
1.黑曲霉诱变株3912—12及发酵条件的试验报告	96
2.黑曲霉诱变株3912—12中间扩大试验报告	105
3.葡萄糖淀粉酶3912—12菌株生产报告	111
4.液体曲在白酒生产中的应用	121
五、硼砂交链羟乙基皂仁胶的性质及微生物酶在油田压裂上的 应用	128
六、T ₆₋₁₃ 菌糖质原料发酵L-谷氨酸试验报告	148
七、醋酸发酵谷氨酸研究报告	158
八、淀粉水解糖发酵甘油研究报告	175

开 门 办 所 好

天津市工业微生物研究所

我们所在毛主席革命路线指引下,无产阶级文化大革命以来,坚持以阶级斗争为纲,进一步加强了党对科研工作的领导,坚持科研工作为无产阶级政治服务,为工农兵服务,与生产劳动相结合的方针,坚定地实行开门办所,使我们研究所的面貌发生了很大的变化,科研人员的阶级斗争、路线斗争觉悟有了很大提高,科研工作的步伐越来越快,科研成果逐年增多。实践使我们认识到,开门办所就是好。

1.坚持开门办所,才能使科研工作沿着为无产阶级政治服务,为工农兵服务,与生产劳动相结合的方向前进。

我们所是研究食品发酵工业领域中新产品、新工艺、新技术的专业研究机构。历年来所承担的研究项目,与工业生产、国防建设、人民健康、出口援外都有着密切关系。无产阶级文化大革命前,由于刘少奇修正主义科研路线的影响,使科研工作长期脱离无产阶级政治,脱离生产实际,脱离工农群众。不少科研项目,因方向不明脱离实际不得不半途而废,耽误了时间,浪费了资财。无产阶级文化大革命开始以后,我所广大革命群众奋起造了修正主义科研路线的反,批判了修正主义科研路线。联系过去走过的弯路,认真总结了经验教训,逐步分清了路线是非,明确了科研工作必须坚持为无产阶级政治服务,为工农兵服务,与生产劳动相结合的方向,必须走开门办所搞科研的道路。认清了开门办所与关门办所虽只有一字之差,但是却反映了两条根本对立的路线。“开门”,就是坚持科研为无产阶级政治服务,为工农业生产服务的方向,坚持理论与实际相结合、科研与生产相结合的原则,坚持知识分子与工农相结合,限制资产阶级法权,向着缩小三大差别的方向前进;“关门”,就是反对无产阶级政治挂帅,把工农群众拒于科学研究的大门之外,就是要使科研回到文化大革命前那种“三脱离”的老路上去。

我们在实行开门办所中,进一步加强了党对科研工作的领导,坚持“独立自主、自力更生”的方针,坚持走自己工业发展的道路,坚持赶超世界先进水平。我们的作法是:(1)我们采取请进来的办法,让所内外一些有丰富实践经验的工人同志到研究所、实验室参加科学研究的领导和管理的工作,除了在本所选拔老工人参加科研工作的组织领导工作外,我们还先后从市内外十几个有关工厂请进工人50多人到研究所参加科学实验。(2)组织科技人员下楼出所,深入生产实践。文化大革命中,我们健全和发展了所办试验工厂,广大科技人员除了深入试验车间进行科学实验,还要定期下到车间参加生产劳动。此外,我们还大力组织科技人员下厂蹲点。几年来,有半数以上科技人员先后到本市和外地二十多个工厂参加科学实验和技术推广工作。(3)大兴调查研究,为了使科研工作更好的为无产阶级政治服务,为工农兵服务,在制订科研计划和选题方面必须作认真的调查研究。文化大革命以来,我们多

次组织调查组，由领导亲自带队到有关单位作深入调查，急工农兵之所急，急国家之所需，根据生产需要确定科研项目，然后集中兵力，大干快上，有力地加速了科研进程。（4）设立接待组，接待工农兵的来访和信访，帮助解决各有关生产、使用部门遇到的实际问题，必要时派有关科技人员深入现场同工厂的工人、干部、技术人员紧密结合研究攻关。

为落实毛主席关于“深挖洞、广积粮、不称霸”的指示，解决我国工业用柠檬酸的需要，我们开设了以正烷烃为原料，发酵生产柠檬酸这一课题，开辟不用粮食发酵生产柠檬酸的新途径。科技人员在深入实际调查研究中，了解到社会主义建设急需工业用柠檬酸的情况后，就决心要用最大的力量，最短的时间把它拿下来。同志们遵照毛主席关于“外国有的，我们要有，外国没有的，我们也要有”的教导，破除迷信，解放思想，走出研究所，大搞三结合，经过反复实践，在较短的时间内，选出了菌种，摸索出了发酵条件，使产酸率、转化率、发酵周期等主要技术指标接近了以粮食为原料发酵生产柠檬酸的水平，为我国微生物工业开辟了新的途径。

伟大革命导师恩格斯教导我们：“社会一旦有技术上的需要，则这种需要就会比十所大学更能把科学推向前进。”由于我们实行了开门办所，坚持了科研为无产阶级政治服务，为工农兵服务的正确方向，大大加快了科学研究的进度。文化大革命以来，我们在人员少、时间紧、任务重的情况下，先后完成了18项科研课题，其中有4项在我国发酵行业创造了先进水平。

2.坚持开门办所，提高了科技人员接受再教育的自觉性，有利于改造他们的世界观。

毛主席教导我们：“知识分子如果不和工农民众相结合，则将一事无成。”我们研究所的科技人员大都是从旧学校培养出来的知识分子。坚持开门办科研，就能使广大科技人员投身到三大革命运动中去，走与工农相结合的道路，有利于促进旧思想的转变。他们在与工农群众一道开展科学实验活动中，开阔了眼界，亲眼看到了工人群众伟大的创造力、无穷的智慧和不为名利为革命的崇高品质，从而使他们增添了无产阶级感情，提高了接受再教育的自觉性，促进了世界观的改造和业务上的再学习，这有助于缩小体力劳动和脑力劳动的差别，帮助他们在又红又专的道路上迈开新的步伐。在开门办所中，广大科技人员放下知识分子架子，改变了过去那种“技术人员动嘴，工人动手”、“遇到困难摇头，见脏活累活回头，有名有利钻前头”的资产阶级作风，他们坚持与工人同学习、同研究、同劳动、同战斗。如薯干原料深层发酵柠檬组的科技人员，几年来曾多次下厂，思想收获一次比一次大，科研速度一次比一次快，走与工农相结合的道路越来越坚定。他们曾几次下厂推广新菌种，在实验中每次往发酵罐里投料时他们都坚持和工人一起干，这个活又脏又累，但是他们说：“越是脏活累活，越是改造思想的好机会。”他们和工人群众汗流在一起，劲使在一起。在天津柠檬酸厂的大力支持下，仅用了不到5个月的时间就取得了成效，产酸率提高23%，风量降低40%，增加了生产，缩短了周期，降低了粮耗，受到了工人同志的好评。广大科技人员说，同工人师傅在一起勇气就大，胆子就壮，办法就多，见效就快，真是有使不完的劲，学不完的知识。知识分子也只有与工农群众相结合，才能把书本知识变为完全的知识，有用的知识，才能真正发挥应有的作用。

3.坚持开门办所，有利于加快科研进度，有利于科研工作的深入和提高。

开门办所，推动了知识分子深入实际走与工农相结合的道路，提高了路线斗争觉悟，进

一步调动了广大科技人员的社会主义积极性，每当接受一项任务之后，他们都联想到国家的需要，人民的需要，干起工作来，就能够以个人利益服从革命利益。过去，有的人搞科研，只强调个人兴趣，强调专业特长，强调个人所承担项目的重要性，各自为正，各把一摊，在有些部门科研工作不能集中使用兵力，科研进度受到影响。文化大革命以来，通过开门办所，随着广大技术人员思想面貌的变化，科研工作的进度也得以大踏步地前进。近七、八年来，我们在组织研究工作中，经常根据需要集中兵力打歼灭战，在使用技术力量上，经常有分有合，很多技术人员都能做到服从调动，保证重点科研项目的开展。有时甚至要把某某项目停下来，将全部的人力、仪器设备并入重点项目，同志们都很少有怨言，而是从革命的需要出发，全力投入会战。开门办所的过程中，同志们为了一个科研项目的上马，大家齐心协力，我们所有很多个项目组，都曾多次进行“会诊”，“会诊”就是把各项目组的同志聚在一起，共同研究某一个项目中遇到的问题，这样就充分发挥了集体的智慧，特别是三结合的会战组，就更是如此，来自生产第一线的工人、干部和技术人员同讨论，同实验，大大推动了科学研究的进程。正因为这样，文化大革命以来，我们基本改变了过去那种“科研，科研，一干几年”的状况，有些研究项目，从选育菌种，到扩大实验用不到一年的时间就得到了圆满成功。

有的人担心开门办所会影响科学研究工作的深入和提高，我们的体会恰好相反。几年来的实际经验，使我们认识到开门办所开阔了我们的眼界，打开了科学研究工作的广阔天地，工农业生产实践为科学研究提供了丰富的课题，更加感到大有作为。我们所和天津葡萄糖厂一起协作曾经在文化大革命的初期完成了糖化酶菌种的选育和酶法生产葡萄糖新工艺的研究。由于当时只把糖化酶的应用局限在葡萄糖的工业生产上，所以这个研究课题投入生产后，就有点船到码头、车到站的想法，认为这项研究工作已告一个段落。但是，在我们开门办所，深入实际，调查研究的过程中，糖化酶小组的同志了解到，糖化酶在以粮食作原料的很多发酵产品中有着广泛的应用。因而认识到提高糖化酶活力对于节约粮食，增加生产，改进一些发酵产品的操作都是有利的措施。于是他们又给自己提出了选育糖化酶新菌种，提高糖化酶活力的研究任务。近年来，承担这一任务的全体同志怀着为社会主义多作贡献的雄心壮志，积极地开展了选育新菌株的大量试验，经过几千次的筛选工作和反复实验，在较短的时间内获得了一株生长快、酶系纯、适应低pH值的新菌株，酶活力提高了近两倍。达到国内先进水平。目前已推广应用在葡萄糖、酒精、白酒、食醋、制药等生产方面，取得较好效果。

通过无产阶级文化大革命，我国的科研工作呈现出一片莺歌燕舞的大好形势。我所广大科研人员在毛主席革命科技路线指引下，方向明，志气高，干劲大。大家表示要以“**可上九天揽月，可下五洋捉鳖**”的英雄气概，继续深入批判修正主义科技路线，积极投身到阶级斗争，生产斗争和科学实验三大革命运动中去，为保卫无产阶级文化大革命的胜利成果，为发展我国的社会主义科学事业而努力奋斗。

解脂假丝酵母 B_{74} 利用液体石蜡发酵 生产柠檬酸的研究

天津市工业微生物研究所

天津市糖精厂

天津市柠檬酸厂

摘 要

在毛主席“备战、备荒、为人民”的伟大战略思想指导下，为节约和代替柠檬酸生产用粮，于1970年开始进行石油发酵柠檬酸的研究。通过摇瓶小试和500升、2500升罐试验，应用 B_{74} 菌以液蜡12%、硫酸0.3%、磷酸氢二铵0.15%、 KH_2PO_4 0.05%、 $MgSO_4$ 0.05%、麦麸0.5—0.75%、 $CaCO_3$ 6%为发酵培养基，接入2%二级种子，发酵5天产酸达6%以上，对液蜡重量转化率达到70%，提取总收率70%以上，初步估算成本5800元/吨。

本报告报导了 B_{74} 菌株在摇瓶发酵中氮源和有机营养源种类、浓度、装液量大小对产酸的影响，确定以麦麸为营养源的基础培养基。在罐上发酵试验中，研究了通风搅拌、钙的流加方式与柠檬酸生成的关系，并对提取方法、提取收率以及成本进行了估算。

一、前 言

发酵工业历来依靠淀粉等糖质为原料，存在着与粮食供应的矛盾，因此，就成为科学研究的重要课题。

自60年代，英国石油公司试验成功了利用酵母石油脱蜡和石油蛋白生产以来¹⁾，以烃为原料发酵有机酸、氨基酸、维生素以及糖类等研究得到迅速发展，以石油烃或石油化工制品为原料代替粮食的发酵工业展示了可观的前景。

1969年日本田渊²⁾等分离得到产柠檬酸的解脂假丝酵母，以正烷烃为碳源，发酵柠檬酸小试取得成功。柠檬酸产率8.0~9.0%具有实用价值。相继日本协和发酵公司石油发酵柠檬酸亦研究成功，并投入试验性生产，年产规模为30~100吨。柠檬酸产率为6~9%³⁾。由此引起许多国家注视，已有20多个厂向日本请求此项专利。

目前世界上柠檬酸总产量约为14万多吨，如果以丰富的石油烃代替一部分粮食，无疑地为柠檬酸发酵开辟原料新途径作出贡献。

在毛主席革命路线指引下, 深层发酵生产柠檬酸的新技术自1968年投产以来, 得到迅速发展。但当前柠檬酸生产仍不能满足国民经济发展需要。北京、上海、沈阳先后开展以石油烃代粮发酵柠檬酸的研究工作⁴⁻⁷⁾并取得显著成绩。

为了贯彻执行毛主席“备战、备荒、为人民”的伟大战略方针, 早日完成不用粮食生产柠檬酸的科研任务, 我市于70年开始此项研究, 在市科技局、一轻局领导支持下, 我们与南大生物系、柠檬酸厂、糖精厂等兄弟单位大力协作, 在所党支部领导下, 实行工人、技术人员、领导三结合, 坚持以路线教育、批修整风为纲, 调动参加研究工作的全体人员积极性, 鼓足干劲, 力争上游, 克服了水电不足等各种困难, 以中国科学院微生物研究所B₇₄柠檬酸产生菌经过摇瓶小试, 并经500升罐几十批次的试验和2500升罐5罐次的验证, 柠檬酸产率稳定在6%以上, 并且摸索出一套以廉价的麦麸作有机营养物质为特点的工艺条件。提取率为70%, 柠檬酸质量符合药典规定, 经济成本初步估算每吨为5833.95元。这一试验成功, 为摆脱依靠粮食发展柠檬酸工业生产提供了基本数据。现将试验总结报告如下:

二、研究试验部分

(一) 摇瓶试验

1. 菌种来源

①本所保藏菌种10株;

②土壤筛选分离175株;

③由科学院微生物所提供解脂假丝酵母B₇₄菌一株,

由以上菌株进行筛选比较, 结果B₇₄菌产酸最高, 故以B₇₄菌为试验菌株进行大量摇瓶试验。

2. 材料与方法

①斜面培养基:

(NH₄)₂SO₄ 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, Na₂HKO₄·12H₂O 0.05%, MgSO₄ 0.05%, 10波美麦芽汁10%; 锦西重蜡每支2~3滴, 琼脂2%, pH自然, 蒸汽灭菌1 kg/cm² 20分钟, 斜面接种后, 置28℃保温箱培养4天, 转存冰箱备用。

②基础发酵培养基:

NH₄Cl 0.3% KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, 酵母膏0.05%, 锦西重蜡*8%, CaCO₃ 2%, pH自然, 蒸汽灭菌1 kg/cm² 20分钟。

③发酵条件:

250毫升三瓶, 装液20毫升, 接入培养好的斜面种子一接种环, 置回转摇床 (偏心距2.5厘米, 200转/分), 温度28±1℃, 发酵5天, 取样测定。

④测定方法:

滴定酸即游离酸, 用0.1429N NaOH滴定的毫升数表示。

总酸滴定酸加CaCO₃量×1.4倍

柠檬酸用五溴丙酮法测定。

3. 试验内容及结果

*锦西重蜡系C₁₂~₁₈比重0.75

①通风量对产酸的影响

为了探索溶解氧与产酸关系

使用基础培养基，分二个组，一组是用500ml三角瓶，二组是用250ml三角瓶，装液量为15, 20, 40ml，发酵条件同材料与方法一节。

表1 通风量对产酸的影响

组 别	瓶 号	装液量(ml)	总 酸	备 注
(1)	1	40	5.80	
	2	40	5.45	
	3	20	9.40	
	4	20	9.60	
(2)	5	20	5.40	
	6	20	5.70	
	7	15	6.80	
	8	15	6.30	

表1结果表明，装液量少，通气量则大，产酸也较高，对柠檬酸生成有利。500ml三角瓶装20ml产酸最好。以下试验除注明外均用20ml装液量。

②不同发酵培养基对产酸的影响

选用以下五组培养基并以基础培养基71—20为对照，比较产酸结果如表2

表2 发酵培养基对产酸的影响

成 分		编 号					
		71—20	72—24	72—28	72—32	72—37	72—42
		浓 度					
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	0.25	0.20	—	—	0.40	
KH ₂ PO ₄	0.05	0.10	0.10	0.05	0.10	0.05	
MgSO ₄	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
NH ₄ Cl	0.30	—	—	0.44	0.20	—	
K ₂ HPO ₄	0.05	0.10	0.10	0.05	0.10	—	
酵母膏	0.05	—	—	—	0.10	—	
玉米浆	—	0.2	0.10	0.1	—	—	
麦麸*	—	—	—	—	—	0.50	
重蜡	8	1	8	8	10	8	
CaCO ₃	2	5	1	1	1	4	
测定结果	总酸 %	8.4	7.18	5.75	4.6	5.35	10.05

表 2 结果说明, 发酵培养基组成对产酸有很大影响, 其中以72—42培养基用0.5%麦麸*产酸率较高, 而用0.2%玉米浆的培养基产酸也比酵母膏为优。以下试验未注明者均采用72—42配方。

③不同氮源对柠檬酸生成的影响

选用三种无机氮 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 探讨不同无机氮对柠檬酸生成的影响。

表 3 不同浓度的无机氮对柠檬酸生成的影响

氮源	瓶号	0.1%		0.15%		0.3%		0.4%		0.5%	
		测定项目									
	滴酸%	柠%	滴酸%	柠%	滴酸%	柠%	滴酸%	柠%	滴酸%	柠%	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	0.1	2.0	—	—	6.05	2.95	8.52	4.3	7.55	3.3
	2	0.1	2.0	—	—	8.30	3.7	9.82	4.85	7.39	4.0
NH ₄ Cl	1	1.3	2.35	—	—	7.65	3.35	9.2	4.35	—	—
	2	1.14	2.4	—	—	6.78	3.35	8.75	3.7	—	—
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	5.1	2.95	4.5	3.25	8.15	4.1	—	—	—	—
	2	4.9	2.8	4.05	2.5	9.5	5.55	—	—	—	—

从表 3 结果可以看出 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 浓度以0.4%对柠檬酸生成较适宜, 在工业生产上应用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 也较经济。

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 对柠檬酸生成有一定促进作用。

④种龄与柠檬酸发酵的关系

表 4 种 龄 与 柠 檬 酸 生 成 的 影 响

种 龄 (小时)	菌 密 度* O.D.值	pH	柠 檬 酸 %
17	0.075	6.0	2.96
18	0.075	5.7	3.47
20	0.10	4.5	3.97
22	0.17	4.5	4.93
24	0.18	4.5	5.55
26	0.20	2.4	5.10

*菌密度稀释10倍, 580mμ测定

*麦麸指麸皮干物重量计算。处理方法: 麸皮: 水为 1 : 5, 再加麸皮量的0.2%工业HCl, 搅匀后浸泡一夜, 0.5kg/cm²30~40分钟蒸煮后过滤, 取其滤液加入培养基中。

根据第72—42发酵培养基配方略有变动如下：

种子培养基： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%， KH_2PO_4 0.1%， Na_2HPO_4 0.1%， MgSO_4 0.1，麦麸 2%，重蜡 5%。

培养一级种子，分别为17，18，20，22，24，26小时及时转接发酵，发酵5天，取样测柠檬酸含量，其结果表4：

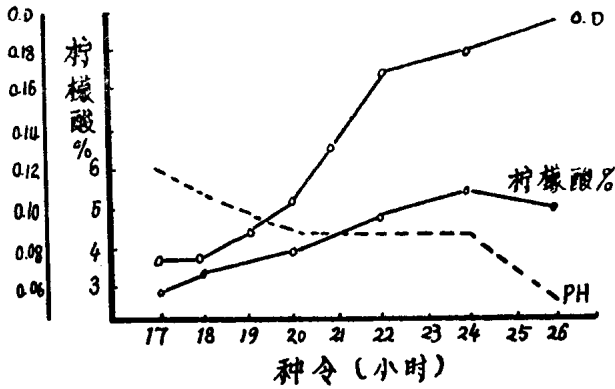


图1 不同种龄对产酸的影响

表4和图1说明种龄过短或过长，均不利柠檬酸的积累，在所试条件下以20至24小时种龄较为妥当。

⑤有机营养物的选择

通过发酵培养基的选择，以麦麸组成培养基总酸产率最高，但对柠檬酸产率如何，有必要进行以下试验。试验选用酵母膏、玉米浆和麦麸三种有机营养物进行对比，培养基在250毫升三角瓶内装15毫升，发酵5天后测定。

表5 不同有机营养物对产酸影响

有机氮源	浓度 %	柠檬酸 %
酵母膏	0.10	5.78
	0.50	5.78
玉米浆	0.10	5.64
	0.05	4.94
麦麸	0.50	5.46

试验结果说明，0.1%酵母膏、玉米浆与0.5%麦麸产酸水平比较接近，但酵母膏价格高，玉米浆不能保证供应，因此从生产角度考虑用麦麸代替以上两种有机营养物也是经济合理的。

⑥麦麸浓度对柠檬酸生成的影响

为进一步探索不同麦麸浓度对柠檬酸生成的影响,在72~42培养基中分别用0.1%,0.2% 0.4%0.5%0.8% 1 %不同浓度麦麸发酵 5 天,测定结果如图 2。

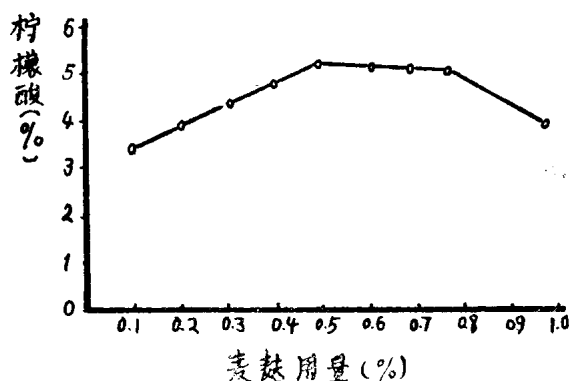


图 2 麦麸用量与柠檬酸生成的关系

图 2 结果表明麦麸用量过低,过高均不理想,麦麸浓度在0.5~0.8%比较适宜。

⑦碳酸钙加量与柠檬酸生成的关系:

在发酵中添加 CaCO_3 控制pH以利于柠檬酸的积累,在国外已有报道⁶⁾,但菌株不同耐酸性有差别,因而进行 CaCO_3 添加量的试验。

发酵培养基中分别用 1 %、3 %、4 %、5 %、6 %、8 % CaCO_3 ,油量10%,培养基分装20毫升于250毫升三角瓶内,发酵 5 天,测定柠檬酸含量。

表 6 碳 酸 钙 加 量 对 产 酸 的 影 响

CaO_3 %	pH	柠 檬 酸 %
1	2.7	4.45
3	2.7	4.55
4	2.9	4.80
5	3.2	5.15
6	3.6	5.25
8	5.0	4.45

表 6 结果表明,随 CaCO_3 量增加,柠檬酸积累量也增加,而 CaCO_3 浓度在 4 %~6 %柠檬酸产率较高。

柠檬酸发酵中 CaCO_3 的加入量是很必要的;主要是生成柠檬酸钙而起缓冲作用,使发酵pH控制在较适宜的范围内,有利于柠檬酸的积累。但 CaCO_3 的加量过高,由于摇瓶通风受到限制,pH升高,所以产酸反而下降。在小试中添加 CaCO_3 也有困难,有待中型试验中进行探讨。

4.小结

①B₇₄解脂假丝酵母菌种,经过发酵条件研究试验,产酸能力大为提高,由原始总酸6%左右提高到10%以上,转化率达168%,其中柠檬酸与异柠檬酸各占约50%。柠檬酸产酸率一般在5%左右,具有工业生产价值,说明该菌是一株产柠檬酸能力比较强的菌株。

②B₇₄菌对有机营养物要求不高,发酵条件结果证明,以玉米浆、麦麸和酵母膏比较,产酸基本相近,但是酵母膏价值高昂,玉米浆又不能保证供应,故用麦麸是最廉价最易取的。根据小试,麦麸用量在0.5~0.8%柠檬酸产率较高,因此,发酵培养基组成简单,有利于实现工业化。

③实验发现CaCO₃加量对柠檬酸形成影响较大,发酵培养基中加4%~6%浓度的CaCO₃对柠檬酸的积累有利。

④摇瓶试验结果证明,通气量大有利柠檬酸的生成。250毫升三角瓶装液量在15~20毫升为宜。为扩大试验提供依据。

⑤在所试条件下,种龄在20~24小时,光密度(O.D.)在0.1以上对产酸较好。

⑥存在问题:

(1)由于条件所限,试验温度直接采用28±1℃。对于温度与pH对产酸影响,在摇瓶中没有进行,有待进一步研究。

(2)对CaCO₃的流加试验,在摇瓶中进行较困难,有待在中型试验进行探讨。CaCO₃浓度根据试验观察分析,在6%以上,估计提高柠檬酸产率有利,但试验CaCO₃浓度到8%反而有所下降,可能是受摇瓶不能相应提高通气状况的原因,有待于罐上进一步试验。

(3)无机氮源用(NH₄)₂HPO₄对柠檬酸生成有一定促进作用,比(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl产酸率较高,但考虑将来生产用量不宜过高,对于(NH₄)₂HPO₄的用量尚须继续试验。

(二) 500升与2500升罐的试验

1. 初步确定的工艺条件

①工艺流程简示:

②发酵设备简介:

种子罐50升、发酵罐500升与2500升,容积如下表7:

③种子培养基与培养条件:

(1)种子培养基组成%:

(NH₄)₂SO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.05, Na₂HPO₄ 0.05,

MgSO₄ 0.1, (NH₄)₂HPO₄ 0.15, 麦麸 2, 液蜡 7

(V/V), pH自然

(2)种子培养条件:

A: 一级种子

装液量 2000ml三角瓶 装200ml

灭菌 1公斤/厘米² 30分钟

种令 22~24小时

培养条件 29~30℃。置往复摇床上(120rpm, 7cm冲程)

B: 二级种子:

装液量 50升罐装液35升

封头高	80mm	175mm	310mm
折边高	25mm	25mm	30mm
搅拌形式	六弯叶涡轮式	六弯叶涡轮式	六弯叶涡轮式
叶 径	112mm	245mm	420mm
盘 径	84mm	184mm	315mm
弦 高	28mm	61mm	105mm
叶 高	22.4mm	49mm	84mm
通气管	单管 ϕ 16mm	单管 ϕ 32mm	单管 ϕ 50mm
档 板	550 $\times$ 32 $\times$ 5	无	2110 $\times$ 120 $\times$ 7
传热形式	夹 套	夹 套	夹 套
传热面积	0.83m ²	2.81m ²	9.69m ²

灭菌： 1公斤/厘米²30分钟

种龄： 20~24小时

接种量： 1~2%

培养条件： 29~30℃ 1公斤/厘米²罐压350转/分搅拌，1:0.5~1:1风量

④发酵培养基与培养条件：

(1) 发酵培养基组成%：

(NH₄)₂SO₄0.3, (NH₄)₂HPO₄0.15,

KH₂PO₄0.05, MgSO₄0.05,

麦麸0.5~0.75, 液蜡12(V/V), pH自然。

(2) 发酵条件：

装液量：500升罐装液350升 2500升罐装液1750升

灭菌： 1公斤/厘米²20~30分钟

种龄： 20~24小时

表 8 通 气、搅 拌 对 柠 檬 酸 生 成 的 影 响

批 号	罐 号	搅拌转数 转/分	通 气 量 V/V/分	柠 檬 酸 %	发酵周期 (小时)	备 注
B—15	9	270	1:1—1:15	6.8	168	
B—17	8	290	1:1	6.5	144	
B—6	10	300	1:0.5	3.36	104	